

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 安田 伸巨

本研究は、犬においてエンドセリン-1 (ET-1) とアレルギー性皮膚炎の関連を明らかにすることを目的として、一連の解析を行ったものである。

第一章：犬のエンドセリン受容体のクローニングおよび正常組織での発現解析

犬のエンドセリン受容体(ET受容体)の2つのサブタイプである ET<sub>A</sub> および ET<sub>B</sub> の遺伝子クローニングを行い、ET-1の前駆体であるプレプロエンドセリン-1 (PPET-1)、ET<sub>A</sub>、および ET<sub>B</sub> の正常組織における発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって解析した。クローニングした犬の ET 受容体遺伝子の塩基配列は、他の哺乳類の相同遺伝子との間で高い相同性を示し、ヒト、マウスおよびラットとのアミノ酸残基の相同性はそれぞれ、ET<sub>A</sub> の場合には 94.1、92.0、および 91.6 %、ET<sub>B</sub> の場合には 97.3、88.3、および 87.4 %であった。RT-PCR の結果においては、PPET-1、ET<sub>A</sub>、および ET<sub>B</sub> が多くの犬正常組織 (皮膚、胸腺、肺、膵臓、脾臓、副腎、腎臓、精巣、子宮、膀胱、胃、十二指腸、結腸、およびリンパ節) にて発現していることが確認された。以上より、ET-1 は犬でも他の哺乳類と同様に多様な機能を持ち得ることが示唆された。

第二章：犬のアレルギー性皮膚炎における血漿中 ET-1 濃度および ET-1 と ET 受容体の病変部での発現

アレルギー性皮膚炎と診断された犬 19 頭において、その血漿中 ET-1 濃度を酵素免疫測定法 (ELISA) にて測定し、さらに病変部での PPET-1、ET<sub>A</sub>、ET<sub>B</sub> mRNA 発現量を定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 PCR) によって相対定量した。血漿中 ET-1 濃度は、アレルギー性皮膚炎症例犬では 0.55~1.31 (平均値 0.92) pg/ml、正常犬では 0.22~1.77 (平均値 0.66) pg/ml であり、症例群の平均値が正常犬のそれよりも有意に低い結果となった ( $p < 0.05$ )。一方、定量 PCR の結果、PPET-1 mRNA の発現量において正常皮膚サンプル群と病変部皮膚サンプル群との間で有意な差は認められなかった。また、ET<sub>A</sub> および ET<sub>B</sub> mRNA の発現量は病変部皮膚サンプル群において、正常皮膚サンプル群よりも有意に低いことが明らかになった ( $p < 0.005$ )。喘息の場合、病変部では ET-1 の発現が増強し、その組織中 ET 受容体の発現量および分布は健常と比較して変化がないことが報告され、さらに ET-1 がその病態形成に重要であることが判明している。しかしながら、本章の結果より、アレルギー性皮膚炎においては ET-1 の作用が明

らかに低下していることが示され、これが喘息との間の病態の違いを反映していると考えられた。

### 第三章：ET-1 の犬の好中球に対する遊走能の解析

犬の白血球の ET-1 に対する遊走能およびそれを媒介する ET 受容体サブタイプの解析を KK-チャンバー法による遊走実験を用いて行った。正常犬 3 頭より採取した末梢血から比重遠心法により末梢血単核球を分取し、また沈殿法により好中球を分取した。遊走実験の結果、好中球において ET-1 に対する強い遊走能が認められ、その遊走細胞数は ET-1 の濃度依存的に増加した。また、ET<sub>B</sub> 特異的アゴニストに対しても濃度依存的な遊走反応が認められた。しかしながら、ET<sub>A</sub> および ET<sub>B</sub> のそれぞれに特異的な競合阻害物質であるアンタゴニストで処理した好中球および無処置の好中球を用いて遊走実験を行った結果、両者の ET-1 に対する遊走能に有意な差を認めなかった。このことから、ET-1 に対する好中球の遊走が ET<sub>A</sub> および ET<sub>B</sub> 以外の未知の受容体を介して起っている可能性が示唆された。ヒトの喘息の病変部には重度の好中球浸潤が見られる一方で、アレルギー性皮膚炎の病変部皮膚では好中球の浸潤がほとんどないことが一般的に認められている。本章の結果により好中球の浸潤に ET-1 が重要であることが示唆されたことから、第二章で認められたアレルギー性皮膚炎の病変部における ET-1 および ET 受容体の発現低下は、本疾患と喘息の間での病態の違い、特に好中球浸潤の程度の差異と関連しているものと考えられた。

今回の一連の研究は、ET-1、ET<sub>A</sub>、および ET<sub>B</sub> の発現と、ET-1 の遊走因子としての機能を解析することにより、犬におけるアレルギー性皮膚炎の病態と ET-1 との関連を明らかにしたものであり、他のアレルギー疾患と本疾患との病態生理学的な差異を説明する新しい知見を提示し得たものとする。

本申請論文を審査した結果、審査委員一同は、博士（獣医学）の学位を授与するに値すると判断した。